

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-59499

(43)公開日 平成8年(1996)3月5日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	A D Z			
// A 6 1 K 35/64	A B A	7431-4C	A 6 1 K 37/ 02	A D Z

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平6-221154

(22)出願日 平成6年(1994)8月23日

(71)出願人 391004610

株式会社パイオックス

東京都中央区東日本橋2丁目24番7号

(72)発明者 野村 潤一郎

宮崎県宮崎市平和が丘北町22-11

(72)発明者 横山 桂子

埼玉県大宮市日進町2-1337-5 パフオ  
日進202号

(72)発明者 小林 洋一

東京都小平市上水本町6-18-18

(74)代理人 弁理士 松井 茂

(54)【発明の名称】 感染防御機能増強剤

(57)【要約】

【目的】 ローヤルゼリーを原料とする、細菌等の感染に対する防御機能を有し、食品、飲料等に添加しやすく、経口摂取しやすい感染防御機能増強剤を提供する。

【構成】 生ローヤルゼリーの水懸濁液、又は生ローヤルゼリーから塩析等によって得られた粗蛋白質溶液に、好ましくは基質に対する作用部位の異なる二種類以上のプロテアーゼを作用させて、分子量3000以下のペプチドを含有する透明な溶液を得る。この溶液を、必要に応じて更に粉末化して本発明の感染防御機能増強剤を得る。この感染防御機能増強剤は、そのまま摂取してもよく、例えば、ハチミツ等に混合して摂取してもよく、栄養ドリンクや清涼飲料水等に混合して摂取してもよい。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ローヤルゼリー中の蛋白質をプロテアーゼによって分解して得られる分子量3000以下のペプチドを有効成分として含有することを特徴とする感染防御機能増強剤。

【請求項2】 生ローヤルゼリーを直接プロテアーゼによって分解して得られる請求項1記載の感染防御機能増強剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ローヤルゼリー中の蛋白質をプロテアーゼによって分解して得られるペプチドを有効成分とする感染防御機能増強剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ローヤルゼリーは、若い働き蜂の分泌線（下咽頭線、大腮腺）から分泌される乳白色を帯びた強い酸味のある物質で、女王蜂を育てるための特別な餌となるものである。ローヤルゼリーの成分については、まだ不明の点もあるが、ビタミン、ミネラル、アミノ酸、アセチルコリン、10-ヒドロキシデセン酸、ステロール、ホルモンなどの栄養成分をバランスよく含み、人体に対して好ましい生理活性を持つことが知られている。そのため古くから、生タイプ、カプセルタイプ、飲料タイプなどの健康食品、医薬品、化粧品等として利用されている。

【0003】ローヤルゼリーの生理的機能については、これまでも種々の報告がなされている。例えば、村上らにより *in vitro* の系におけるローヤルゼリーのIgG、IgMの産生促進作用（Agric. Biol. Chem., 54(4), 1087-1089, 1990）、並びにIFN- $\gamma$ の産生促進作用（'90、'91 農芸化学学会講演要旨集）が報告されている。また、米倉らによりヒト単球培養細胞の増殖促進効果（'92 生化学会講演要旨集、No.2035）が報告されている。

【0004】また、本発明者らは、ローヤルゼリーの *in vivo* での生理的機能に与える影響について検討し、ローヤルゼリーの経口摂取が、病原性大腸菌やサルモネラ菌の感染を防御するうえで有効であること（'93 農芸化学学会講演要旨集）を見出した。また、その活性は、ローヤルゼリーの分子量3000以下の低分子画分において強いこと（'94 農芸化学学会講演要旨集）を報告した。

【0005】一方、本発明者らは、生ローヤルゼリーを基質に対する作用部位の異なる二種類以上のプロテアーゼで処理することにより、生ローヤルゼリーと同様な成分を含有し、しかも透明で、安定性に優れ、飲料等にも添加しやすく、したがって経口摂取しやすい透明なローヤルゼリー溶液が得られることを見出し、特願平3-255921号としてすでに出願している。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】ローヤルゼリーは、上

記のように感染防御機能増進作用を持つものの、生ローヤルゼリーは粘稠で、水に溶けにくく、黄白色で生臭いような独特の風味を有し、かつ食すると喉を刺すような強烈な刺激があり、更に加熱などの処理に対して不安定であり、常温では保存しにくい等の問題を有するものである。

【0007】そのため、ローヤルゼリーの感染防御機能増進作用を有効に活用するため、例えば食品等に添加しようとしても添加しにくく、また飲料に添加すると濁りを生じ、更に、その風味や刺激のために食しにくいという問題があった。

【0008】また、感染防御機能増進作用は、ローヤルゼリーの分子量3000以下の低分子成分に特に強いが、ローヤルゼリー全体からみると低分子成分の量は少なく、高価なローヤルゼリーを有効に利用しきれないという問題があった。

【0009】本発明は上記問題点に鑑みてなされたもので、その目的は、ローヤルゼリーの感染防御機能増進作用を効果的に、有効に生かすことができ、食品、飲料等に添加しやすく、経口摂取しやすい感染防御機能増強剤を提供することにある。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意研究した結果、ローヤルゼリー中の蛋白質をプロテアーゼによって分解して得た分子量3000以下のペプチドが、優れた感染防御機能増進効果を有することを見出し、この事実に基づいて本発明を完成させるに至った。

【0011】すなわち、本発明の感染防御機能増強剤は、ローヤルゼリー中の蛋白質をプロテアーゼによって分解して得られる分子量3000以下のペプチドを有効成分として含有することを特徴とする。

【0012】以下、本発明について好ましい態様を挙げて、詳細に説明する。本発明の感染防御機能増強剤は、ローヤルゼリー中の蛋白質をプロテアーゼによって分解して得た分子量3000以下のペプチドを含有するものであればよい。このペプチドは、生ローヤルゼリーの水懸濁液、あるいは生ローヤルゼリーから塩析等によって分離した粗蛋白質溶液に、プロテアーゼ、好ましくは基質に対する作用部位の異なる二種類以上のプロテアーゼを、同時又は逐次添加して室温以上の温度に保持し、酵素反応させることにより得られる。

【0013】この場合、プロテアーゼとしては、微生物や植物起源の酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼや、ペプシン、パンクレアチン等の哺乳動物由来の消化酵素など、通常、食品加工に用いられているものを使用することができ、これらの中から基質に対する作用部位の異なる二種類以上を選択して用いることが好ましい。

【0014】プロテアーゼによる処理は、蛋白質の分解

率を経時的に測定し、分解率が最高に到達した時点で打ち切るのが好ましく、最終分解率は、使用するプロテアーゼにより異なるが、分解率が75%以上、好ましくは85%以上となるまで行うのが好ましい。なお、上記製造法の詳細は、特開平3-255921号に記載されている。

【0015】こうして得られたローヤルゼリーのプロテアーゼによる分解物は、分子量3000以下のペプチドを含有している。また、生ローヤルゼリーの水懸濁液に、プロテアーゼを直接作用させた場合には、蛋白質が分解されてペプチド化している以外は、生ローヤルゼリーと同様な成分を含有している。

【0016】このローヤルゼリーの分解物は、水溶液にしたときに透明で、安定性に優れており、したがって飲料等にも添加しやすく、経口摂取しやすいものである。なお、このローヤルゼリーの分解物は、そのまま溶液状で用いてもよく、凍結乾燥、スプレードライなどの手段によって粉末化して用いてもよい。

【0017】本発明の感染防御機能増強剤は、病原性の細菌やウイルスの感染防御に有用であり、特に細菌の感染防御に効果的である。なお、予め摂取しておく、細菌やウイルスに感染しにくく、また、感染しても治りやすいという予防的作用を有するので、感染した後に治療的に摂取するというより、健康食品や医薬品として、日頃から摂取しておくことが好ましい。

【0018】本発明の感染防御機能増強剤は、健康食品や医薬品として、濃縮液、錠剤、カプセル剤等にしてそのまま経口摂取してもよく、例えば、ハチミツ等に混合して摂取してもよく、栄養ドリンクや清涼飲料水等に混合して摂取してもよい。なお、摂取量は、生ローヤルゼリー換算で、1日当たり、0.3～6g程度とするのが好ましい。

【0019】

【作用】本発明の感染防御機能増強剤をマウスに経口摂取させた後、病原性大腸菌に強制感染させると、後述する実施例に示されるように、優れた感染防御機能増強効果がもたらされることがわかった。したがって、人間に摂取させた場合にも、同様な感染防御機能増強効果が得られると考えられる。

【0020】また、ローヤルゼリーをそのまま経口摂取した場合、ローヤルゼリーの蛋白質は生体内の消化酵素では分解されにくく、消化、吸収もされにくいのであるが、本発明の感染防御機能増強剤は、ローヤルゼリー中の蛋白質を予め酵素分解して得たペプチドを有効成分とするので、体内で消化、吸収されやすく、上記感染防御機能増強効果が高められると考えられる。

【0021】更に、ローヤルゼリーをプロテアーゼで処理すると、水に溶けやすくなり、特有のエグ味や、喉を刺すような刺激もほとんどなくなるため、食品、飲料等に添加しやすく、経口摂取しやすくなる。

【0022】本発明の感染防御機能増強剤が、生ローヤ

ルゼリーを直接プロテアーゼによって分解して得られたものである場合には、蛋白質が分解されてペプチド化している以外は、生ローヤルゼリーと同様な成分を含有するので、従来より知られているローヤルゼリーの滋養強壮効果、その他各種の生理活性効果等も期待することができる。

【0023】

【実施例】

実施例1

10 生ローヤルゼリー100gに温水を加えて、ローヤルゼリーの水懸濁液1kgを調製し、20%水酸化ナトリウム溶液を用いて、pHを4にした。この懸濁液に、ペプシン(1:10,000、シグマ社製)0.1gを添加し、45℃で、4時間酵素処理を行って、ペプシン処理液を得た。

【0024】次に、このペプシン処理液を、20%水酸化ナトリウム溶液を用いて、pHを8に調整した後、トリプシン(力価2,000,000単位/g、シグマ社製)1gを添加し、45℃で、4時間酵素処理を行った。

20 【0025】酵素処理を終了した後、10%クエン酸溶液を用いて、pHを5.5に調整し、80℃で、10分間加熱して酵素を失活させ、次いで、濾過して未分解蛋白質や不溶性残渣を除去して、透明な溶液を得た。

【0026】次いで、得られた溶液を凍結乾燥して、ローヤルゼリーのプロテアーゼ処理粉末を得た。

【0027】実施例2

実施例1において、ペプシン処理時間を16時間、トリプシン処理時間を16時間にし、他の条件は実施例1と同様にして、ローヤルゼリーのプロテアーゼ処理粉末を得た。

【0028】実施例3

30 生ローヤルゼリー1kgに、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を添加して10%ローヤルゼリー溶液とした。この溶液に、硫酸を60%飽和となるように添加し、塩析した。この沈殿画分を透析し、次いで凍結乾燥して、ローヤルゼリーの蛋白質画分からなる粉末を得た。

40 【0029】得られた粉末50gに、水を加えて2L(リットル)とした後、6N塩酸を用いて、pHを4.0に調整した。この溶液に、ペプシン(1:10,000、シグマ社製)0.1gを添加し、37℃で、6時間酵素処理を行って、ペプシン処理液を得た。

【0030】次に、このペプシン処理液を、20%水酸化ナトリウム溶液を用いて、pHを8に調整した後、トリプシン(力価2,000,000単位/g、シグマ社製)0.1gを添加し、40℃で、16時間酵素処理を行った。

【0031】酵素処理を終了した後、10%クエン酸溶液を用いて、pHを5.5に調整し、80℃で、10分間加熱して酵素を失活させ、次いで、濾過して異物を除去して、透明な溶液を得た。

50 【0032】次いで、得られた溶液を凍結乾燥して、ローヤルゼリーの蛋白質画分のプロテアーゼ処理粉末を得

た。

#### 【0033】比較例1

生ローヤルゼリー100 g に、水を体積で等量添加し、凍結乾燥してローヤルゼリー粉末を得た。

#### 【0034】比較例2

実施例3において塩析により製造したローヤルゼリーの蛋白質画分からなる粉末を、酵素処理せず、比較例2の粉末とした。

#### 【0035】実験例1（蛋白質の分解率の測定）

実施例1～3の粉末について、以下に示す方法により、10 蛋白質の分解率を測定した。

【0036】サンプル2.0 mlに、等量の10%トリクロル酢酸（TCA）を加えて遠心分離を行い、この上清を希釈した後、ローリー法で比色定量し、TCA可溶性成分の量の推移を調べた。なお、ローヤルゼリー中の粗蛋白質は、TCA溶液のかわりに等量の水を加えた溶液を用い、同様に比色定量して求めた。そして、下記数1に示す式により、蛋白質の分解率を求めた。

#### 【0037】

#### 【数1】

分解率 =  $\{(c-b)/(a-b)\} \times 100\%$

a：ローヤルゼリー溶液の粗蛋白質含有量

b：ローヤルゼリー溶液のTCA可溶性成分の含有量

c：酵素処理サンプルのTCA可溶性成分の含有量 \*

	実施例2の粉末	比較例1の粉末
粗蛋白質	36.0	37.5
糖質	47.0	45.0
脂質	7.5	7.8
デセン酸	6.0	6.2
水分	3.0	2.5

（表1中、単位は重量%であり、デセン酸は10-ヒドロキシ- $\delta$ -デセン酸を意味する。）

【0043】表1の結果から、実施例2で得られたローヤルゼリーのプロテアーゼ処理粉末と、比較例1で得られた生ローヤルゼリー粉末とは、その組成が殆ど同じであることがわかる。すなわち、実施例2で得られたローヤルゼリーのプロテアーゼ処理粉末は、蛋白質が分解されてペプチド化している以外は、生ローヤルゼリーと同様な成分を含有していることがわかる。

【0044】なお、実施例1～3で得られた粉末は、弱酸性の飲料に添加しても、生ローヤルゼリーのように凝集沈殿することなく容易に溶解し、また、そのまま食しても、喉を刺すような刺激もなく、むしろ若干の旨味と甘さがあるものであった。

#### 【0045】実験例4

実施例1、2、及び比較例1の粉末を、2 g/kg/mouseの割合で、1群につき10匹の雄のマウス（ICR mouse（cr ※50

\*【0038】上記の方法により求めた蛋白質の分解率は、実施例1の粉末が85%、実施例2が96%、実施例3が98%であった。

#### 【0039】実験例2（分子量分布の測定）

実施例2で得られたローヤルゼリーのプロテアーゼ処理粉末と、生ローヤルゼリーについて分子量分布を測定し、比較した。なお、測定方法は高速液体クロマトグラフィーにより行った。その結果を図1に示す。図1において、破線Aは実施例2で得られたローヤルゼリーのプロテアーゼ処理粉末の結果、実線Bは生ローヤルゼリーの結果を示す。

【0040】図1の結果から、実施例2で得られた粉末には、分子量1万以上のものがほとんどなくなって、分子量3000以下のペプチドが主成分となっており、特に、分子量数百～1000のものが多く残っていることがわかる。このことは、電気泳動等の結果からも確認した。

#### 【0041】実験例3（成分分析）

実施例2で得られたローヤルゼリーのプロテアーゼ処理粉末と、比較例1で得られた生ローヤルゼリー粉末について成分を分析し、その組成を比較した。その結果を表1に示す。

#### 【0042】

#### 【表1】

※j: (CD-1)、5 週齢 SPF ) に、ゾンデで経口投与した。なお、対照区には、リン酸緩衝化生理食塩水のみを投与した。

【0046】24時間経過後、最小致死投与量の病原性大腸菌液（E.coli, KC-14） $4 \times 10^7$  CFU/0.2ml/mouseを静脈注射した。4 日後に、生存しているマウス数をもって生存率を求めた。その結果を図2に示す。

【0047】図2の結果から、生存率は、対照区では0%であったが、比較例1のローヤルゼリー投与区では40%、実施例1及び実施例2のローヤルゼリーのプロテアーゼ処理物投与区では共に60%であった。このように、ローヤルゼリーには感染防御機能増強効果があり、それをプロテアーゼで分解するとその効果が著しく高まることがわかる。

#### 【0048】実験例5

7

経口投与サンプルを実施例3、及び比較例2の粉末に替えた他は、実験例4と同様にして、マウスの大腸菌感染に対する防御効果を調べた。その結果を図3に示す。

【0049】図3の結果から、生存率は、対照区では0%、比較例2のローヤルゼリー蛋白質画分投与区では50%、実施例3のローヤルゼリー蛋白質画分のプロテアーゼ処理物投与区では80%であった。このように、ローヤルゼリーの感染防御機能増強効果の有効成分は蛋白質画分にあり、それをプロテアーゼで処理することにより更に活性が高まることがわかる。

【0050】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の感染防御機能増強剤は、ローヤルゼリー中の蛋白質をプロテアーゼにより分解して得られる分子量3000以下のペプチドを有効成分として含有するもので、これを経口摂取することにより感染防御機能増強効果が期待される。

【0051】また、ローヤルゼリーをプロテアーゼで処理すると、水に溶けやすくなり、特有のエグ味や、喉を

8

刺すような刺激もほとんどなくなるため、食品、飲料等に添加しやすく、経口摂取しやすくなる。

【0052】更に、生ローヤルゼリーを直接プロテアーゼによって分解して得たものでは、蛋白質が分解されてペプチド化している以外は、生ローヤルゼリーと同じ成分を含有するので、感染防御機能増強効果だけでなく、ローヤルゼリーの滋養強壮等の他の効果も期待できる。

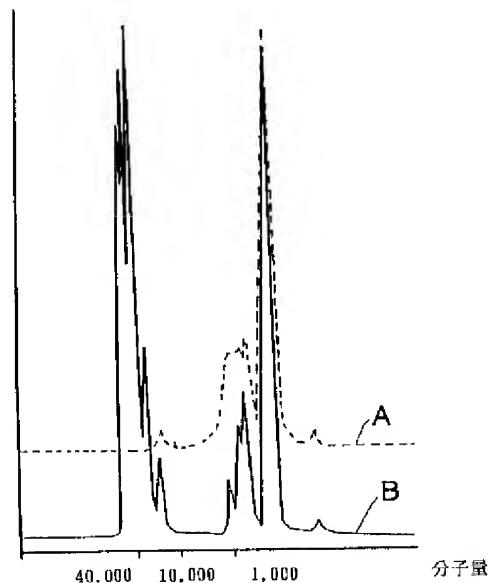
【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2で得られたローヤルゼリーのプロテアーゼ処理粉末と、生ローヤルゼリーの分子量分布を示す図表である。

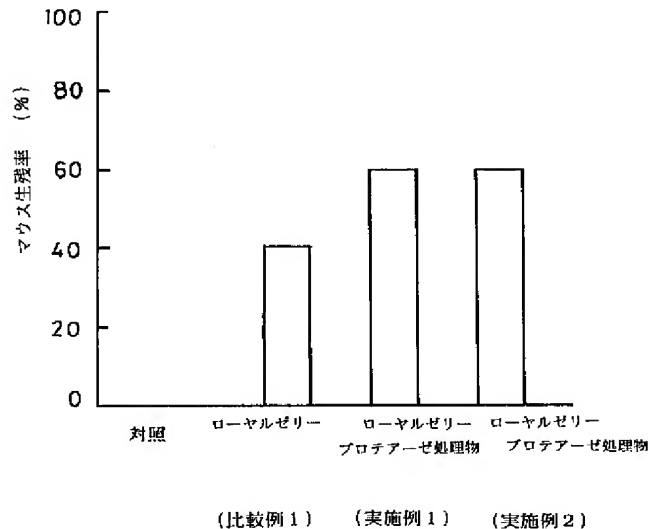
【図2】実施例1、2、及び比較例1の粉末を経口投与したマウスを大腸菌感染させた際の生存率を示す図表である。

【図3】実施例3、及び比較例2の粉末を経口投与したマウスを大腸菌感染させた際の生存率を示す図表である。

【図1】



【図2】



【図3】

